

Intrakoronar injeksjon av benmargceller ved akutt hjerteinfarkt



**Prosjektoppgave
André Meyer V04
våren 2009**

Abstract

Background: Recently, experimental studies have shown improvement on left ventricular function and reduction in infarct scar size after intracoronary injection of autologous cells derived from bone marrow (BMC) in the acute phase of myocardial infarction. There is yet no large clinical trials released about the subject, but five intermediate sized randomized trials have been published.

Method: I have reviewed the five studies BOOST, Janssens et al, ASTAMI, REPAIR-AMI and REGENT, translated and somewhat summarized them before I have discussed the most important and relevant results. To supply my findings, I have included the most relevant results from the two meta-analysis by Abdel-Latif et al. and Martin-Rendon et al.

Results: To this date, it may seem that BMC treatment gives a small to moderate improvement in left ventricular parameters as well as a reduction in infarct scar size. The results are somewhat heterogeneous, but overall they seem to point in a positive direction. In the meta-analyses, BMC therapy is found to significantly improve left ventricular ejection fraction with 3,0 – 3,6 % points. Some of the studies suggest that better results can be expected on patients with severely depressed left ventricular function, as well as when cells are injected five or more days after the PCI treatment.

Conclusion: Stem cell treatment for acute myocardial infarction is a promising, new treatment option. The data from the trials assessed suggest that one can achieve improvement on top of conventional therapy, if yet only moderate. Further, adequately powered trials using optimal dosing and timing, longer term outcome assessments, more reliable and more patient-centered outcomes are required before this treatment can be considered for routine clinical use.

Introduksjon

Til tross for betydelig terapeutisk utvikling de siste år, er hjertesvikt i kjølvannet av myokardiskemi fremdeles en ledende årsak til morbiditet og dødelighet i den vestlige verden. Ved hjerteinfarkt og iskemisk kardiomyopati er det irreversibelt tap av myokard som består av hjertemuskelceller (kardiomyocytter) og vaskulatur bestående av endotelceller og glatte muskelceller. Tap av myokard fører til redusert hjertefunksjon.

Selv om tidlig revaskularisering og god medikamentell behandling bedrer prognosen ved akutt hjerteinfarkt, er det også behov for terapeutisk behandling som retter seg mot regenerering av tapt myokard. Inntil nylig har hjertet vært ansett som et postmitotisk organ uten evne til å regenerere. Likevel er kardial hypertrofi forårsaket av cellehypertrofi og cellehyperplasi (1). Kardiomyocytter i både cellesyklus og i mitose er observert, og det er sett en signifikant økning av disse etter store hjerteinfarkt (2). Det er blitt estimert at alle kardiomyocytter som tapes i et akutt hjerteinfarkt kan gjenvinnes i løpet av noen få måneder, men at denne prosessen kun er begrenset til det gjenlevende myokardet og grensesonen mot selve infarkt (3). Kardielle stamceller er blitt funnet (4), og kardiomyocytene dør jevnlig ved apoptose og nekrose og blir erstattet av nye (3). Likevel gror akutte hjerteinfarkt med arrdannelse (5). Særlig store og transmurale hjerteinfarkt fører til remodelering, karakterisert ved endring i geometrien og størrelsen av venstre ventrikkel, og dette er assosiert med redusert overlevelse (6).

Ut fra disse funn om at hjertet faktisk har en evne til å regenerere vev, har nå forskningen begynt å rette øynene mot en helt ny retning innen behandling. Fra å forsøke å begrense skaden ved et infarkt mest mulig øyner man nå også håp om å kunne regenerere det skadede området og gjenvinne den tapte hjertefunksjonen.

Celletransplantasjon

Myoblaster tatt fra muskelbiopsier har vært transplantert til pasienter med kronisk iskemisk hjertesvikt og har resultert i bedret ventrikkelfunksjon (7). Disse cellene forblir likevel elektrisk isolert da de ikke selv innehar gap-junctions, og dette kan muligens predisponere for de ventrikulære arrytmier som ble observert etter myoblasttransplantasjonen.

Benmargen inneholder bl.a. hematopoietiske stamceller (HSC), mesenkymale stamceller (MSC) og endoteliale prekursorceller (EPC). Felles for alle benmargceller (BMC) med stamcelleegenskaper er at de er mononukleære. Etter benmargtransplantasjoner er celler fra donor blitt funnet i ikke-hematopoietisk vev slik som hjerne (8), lever (9) og tverrstripet muskulatur (10). I 2001 kunne både Kocher et al. og Jackson et.al. rapportere om transplanterte BMC som hadde

utviklet seg til kardiomyocytter ved såkalt transdifferensiering(11, 12), dvs voksne stamcellers evne til å modnes til celler som er forskjellige fra deres normale cellelinje. Evnen til å transdifferensiere kalles plastisitet. Samme år viste Orlic et al. i en forsøksmodell på akutt hjerteinfarkt i mus hvor BMC ble injisert inn i periferien rundt infarkt, at de transplanterte BMC hadde utviklet seg til kardiomyocytter, glatte muskelceller og endotelceller, altså alle celletyper som inngår i fullverdig myokard (13). Venstre ventrikkels pumpefunksjon ble også bedret. Disse tre basale studiene har stått sentralt i fagfeltet som grunnlag for å utføre de senere kliniske forsøk som er gjort på mennesker.

Videre er det hos hjertettransplanterte menn som har mottatt organ fra kvinnelig donor funnet et betydelig antall Y-kromosom positive kardiomyocytter, arterioler og kapillærer i myokardet ved obduksjon (14). Hos kvinner som hadde mottatt benmarg fra menn, ble det ved obduksjon funnet 0,23 % Y-kromosom positive kardiomyocytter i hjertet (15). Det er kjent at HSC finnes i perifert blod under normale omstendigheter (16), og det har vært foreslått at progenitorceller ”homer” til myokard og differensierer der til kardiomyocytter, glatte muskelceller og endotelceller (17). Nylig er det funnet mononukleære celler som uttrykker tidlige hjerte-, muskel- og endotelmarkører i perifert blod (18). Antallet av slike celler øker signifikant i kjølvannet av et ST-segment elevasjon myokard infarkt (STEMI), og det kan tenkes at det finnes en populasjon av vevsbestemte stamceller som gjemmer seg i forskjellige nisjer i kroppen og som mobiliseres ved cytokinutslipp induert av vevsskade.

Som konklusjon kan man si at det virker som om myokardskade til en viss grad repareres av hjertets egne stamceller og av sirkulerende progenitorceller fra benmarg, men at dette ikke er tilstrekkelig ved store infarkter.

I håp om å kunne fremme den fysiologiske vevsreparasjonen etter akutte hjerteinfarkt, er det utført studier på mennesker der man har transplantert autologe, stamceller inn i hjertet. Resultatene av disse studiene har indikert en positiv effekt på hjertefunksjonen (13, 19-24). Dette kan skyldes at de transplanterte cellene transdifferensierer til kardiomyocytter, men dette er ikke vist i kliniske studier, og flere forskergrupper har ikke klart å reprodusere transdifferensiering av BMC til kardiomyocytter i eksperimentelle studier (25, 26). Det kan også finnes andre mekanismer som bidrar til bedringen av hjertefunksjonen, for eksempel parakrine effekter som innebærer sekresjon av lokale faktorer som bl.a. kan indusere angiogenese, øket dannelse av kollagen og reduksjon av apoptose. Dette kan i sin tur redusere infarktutvidelsen og remodelering, og bidra til å vekke hibernerende myokard opp fra dvalen (27).

Det er så langt ikke gjort store kliniske forsøk på mennesker på dette feltet der en har kunnet

måle effekter på dødelighet og sykelighet. Det er imidlertid publisert en rekke mindre studier der en har undersøkt om intrakoronar behandling med autologe BMC bedrer venstre ventrikkels funksjon etter hjerteinfarkt. Jeg skal videre gå nærmere inn på de fem største kliniske studiene som er gjort på dette området; BOOST-studien, Janssens et al, ASTAMI-studien, REPAIR-studien og REGENT-studien. Jeg vil nå presentere disse studiene og oppsummere resultatene, og deretter gå over i diskusjonen der jeg vil oppsummere hvor feltet står i dag. I diskusjonen vil jeg også trekke inn resultater fra meta-analyser som er blitt publisert. Det er også gjort kliniske studier på slik behandling til pasienter med etablert hjertesvikt, men jeg kommer til å fokusere min oppgave på behandlingen av akutte hjerteinfarkt.

BOOST- studien(Juli 2004)

Dette var den første store kliniske studien som ble gjennomført. Det var en randomisert kontrollert studie der undersøkerne var blindet, men det ble ikke gitt placebo til kontrollgruppen. Hensikten var å vurdere effekten på venstre ventrikkels funksjon ved å overføre autologe BMC intrakoronart etter et akutt hjerteinfarkt som var blitt vellykket behandlet med PCI. Man fant her en signifikant forbedring av venstre ventrikkels systoliske funksjon i forhold til kontrollgruppen etter 6 måneder (24), men denne effekten var ikke lenger signifikant etter 18 måneder(28).

Metode

Pasienter, inklusjon og eksklusjonskriterier

Pasientene ble inkludert dersom de var blitt innlagt inntil fem dager etter symptomdebut på et førstegangs STEMI, hadde blitt vellykket behandlet med PCI med implantasjon av stent i den infarktrelaterte arterien, og dersom det med angiografi rett etter PCI ble påvist hypokinesi eller akinesi i mer enn to tredjedeler av venstre ventrikkels anteroseptale og-/eller laterale og/ eller nedre vegg. Pasientene ble ekskludert dersom de var flerkarsyke, hadde lungeødem, kardiogent sjokk, avansert nyre- eller leverdysfunksjon, dokumentert terminal sykdom eller kreft.

Studiedesign

Pasientene ble randomisert 1:1 i en kontroll- og en BMC gruppe. Det var 30 pasienter i hver gruppe, 60 totalt. Etter randomiseringen ble det tatt MR av hjertet av samtlige. Alle pasientene ble behandlet med aspirin (300mg daglig i 4 uker etter PCI, deretter 100mg daglig), clopidogrel (300mg startdose, deretter 75mg daglig i minst 4 uker etter PCI), en ACE-hemmer eller angiotensin reseptor antagonist, betablokker og et statin (dersom LDL kolesterol var over 2,6mmol/L), så sant ingen av medikamentene var kontraindisert. Klinisk kontroll ble utført 3 og 6 måneder etter utskrivelse. Ved 6 månederskontrollen ble MR av hjertet gjentatt. Det ble også gjort ny koronar angiografi for å vurdere grad av restenose i stenten de fikk lagt inn. Restenosegraden ble vurdert med kvantitativ angiografi (CMS, Medical Imaging Systems, Leiden, Nederland). Undersøkelsene ble analysert av undersøkere som var blindet for randomiseringen.

For å vurdere om BMC transplantasjonen kan virke proarytmisk, ble pasientene overvåket med 24t Holter monitorering før utskrivelse, etter 6 uker, 3 mnd og 6mnd. Gjennomsnittlig VES pr time ble beregnet, og også antall VES-løp og VT ble registrert. I tillegg ble pasientene satt opp til å gjennomgå en programmert ventrikulær stimulering ved kontrollen etter 6 måneder.

Cellebehandling

Etter MR ble det høstet benmarg fra pasientene i BMC gruppen. Benmargen ble behandlet med 4 % gelatine-polysuccinate density gradient sedimentation ifølge reguleringene for Good Manufacturing Practice (GMP) (Cytonet, Hannover, Tyskland) for å redusere volumet av preparatet samt å fjerne erytrocytter og plater. Sluttproduktet av BMC ble så vasket og overført i fysiologisk saltvann med 10000 U/L heparin.

Det ble brukt et automatisk hematocytometer for å måle antall kjerneholdige celler, pakket cellevolum og plateantall i det ubehandlede benmargaspiratet og videre i det ferdig behandlede benmargpreparatet. Levedyktigheten av kjerneholdige celler ble vurdert med tryptan blue exclusion. Antall CD34+ celler ble målt med flow cytometri analyse (FACSCalibur, BD Biosciences, Heidelberg, Tyskland) med antistoff fra Beckman Coulter (Krefeld, Tyskland). Hematopoietisk kolonidannende cellevekst ble målt med en metylcellulose assay (StemCell Technologies, St Katharinen, Tyskland).

6-8 timer etter innhøstningen av benmargen, ble benmargcellepreparatet injisert inn i den infarktrelaterte arterien via det sentrale lumen av et ballongkateter. For å gi benmargcellene mest mulig kontakttid med mikrosirkulasjonen, ble ballongen midlertidig blåst opp inne i stenten for å hindre antegrad blodstrøm under infusjonene. Hele benmargcellepreparatet ble infusert i løpet av fire til fem okklusjoner à 2,5-4min. Mellom okklusjonene ble koronararterien reperfundert i 3min. Denne metoden kalles stop-flow teknikk og er beskrevet av Strauer et al (19).

Endepunkter

Det primære endepunkt i BOOST studien var å undersøke endringer i venstre ventrikkels ejeksjonsfraksjon (VVEF) etter 6 måneder. Som sekundære endepunkt ønsket man å måle endring i venstre ventrikkels endediastolske volum (VVEDV), venstre ventrikkels endesystolske volum (VVESV), venstre ventrikkelmasse, regional veggbevegelse og veggtykkelse samt volumet av late contrast enhancement (infarktstørrelse). Disse målingene ble dessuten gjentatt 18 måneder etter infarkt.

Resultater

Fra januar -02 til mai -03 ble 78 pasienter spurt om å delta i forsøket. 65 pasienter ble så randomisert til behandling. Etter randomisering måtte 5 pasienter trekkes fordi de ikke kunne gjennomføre MR-undersøkelse, enten pga klaustrofobi eller pga alvorlig fedme. Den endelige kohorten inkluderte 30 pasienter i kontrollgruppen og 30 pasienter i BMC gruppen. Samtlige

pasienter mottok optimal medikamentell post -infarkt behandling.

Gjennomsnittstiden fra PCI til MR måling ble gjort var $3,5 \pm 1,5$ dager. Gjennomsnittstiden fra PCI til innhøsting av benmarg var $4,8 \pm 1,3$ dager. Gjennomsnittstid fra symptomstart til intrakoronar injeksjon av BMC var $5,7 \pm 1,2$ dager. I gjennomsnitt ble 128 ± 33 ml benmarg aspirert fra bakre crista iliaca under kort generell anestesi med midazolam og etomidat. Ingen blødningskomplikasjoner forekom under inngrepene.

Under prepareringen av BMC ble volumet av disse redusert til i gjennomsnitt 26 ± 4 ml i sedimenteringsprosessen, og $75 \pm 12\%$ av de kjerneholdige cellene i det opprinnelige aspiratet ble utvunnet. Sluttproduktet inneholdt $24,6 \pm 9,4 \times 10^8$ kjerneholdige celler (viabilitet 99 %), $9,5 \pm 6,3 \times 10^6$ CD34++ celler og $3,6 \pm 3,4 \times 10^6$ hematopoietiske kolonidannende celler. Pakket cellevolum av det endelige BMC preparatet var $33 \pm 11\%$, og antall trombocytter var $183 \pm 93 \times 10^6$ pr ml.

VVEF hadde økt signifikant hos BMC gruppen etter 6 mnd sammenlignet med kontrollgruppen (Utgangsverdi $46,3 \pm 10,6\%$ (BMC) vs $47,8 \pm 9,7\%$ (kontroll), endring $6,7 \pm 9,5\%$ (BMC) vs $1,1 \pm 11,8\%$ (kontroll), behandlingseffekt $5,7\%$ (95% konfidensintervall (CI), 0,2 til 11,3; $P=0,04$)). Det ble ikke funnet noen sammenheng mellom denne forbedringen og antallet BMC som ble injisert inn i infarktområdet.

Det ble ikke funnet signifikante endringer i VVEDV indeks, venstre ventrikkels endesystoliske volum VVESV indeks, venstre ventrikkel masseindeks eller infarktstørrelse mellom kontrollgruppen og BMC gruppen når man sammenlignet første undersøkelse, og etter 6 mnd. Sammenlignet med kontrollgruppen, hadde pasientene i BMC gruppen etter 6 måneder også en bedre regional VVEF og systolisk bevegelse av hjerteveggen i randsonen. Den systoliske bevegelsen av hjerteveggen i infarktsonen ble derimot ikke signifikant forbedret av BMC.

Det er blitt gitt ut en oppfølgingspublikasjon, da man tok pasientene inn igjen til ny MR kontroll etter 18 måneder. Det man fant da, var at den signifikante forskjellen man så mellom de to gruppene ikke lenger var til stede. BMC gruppen hadde en liten nedgang i forbedringen av VVEF i forhold til utgangsverdien, fra $6,7 \pm 9,5\%$ etter 6 måneder til $5,9 \pm 8,9\%$ etter 18 måneder. Dette var fremdeles i samsvar med en varig bedrig av VVEF, men derimot hadde kontrollgruppen forbedret seg i samme periode, fra $1,1 \pm 11,8\%$ etter 6 måneder til $3,1 \pm 9,6\%$ etter 18 måneder, slik at forskjellen mellom de to gruppene ikke lenger var signifikant ($P=0,27$).

Kliniske hendelser

Ingen pasienter døde under studien, og alle ble fulgt opp. Det var ingen stigning av troponin T målt 24 timer etter BMC overføringen, noe som tyder på at prosedyren ikke ga ekstra skade av

myokardet. I oppfølgingstiden måtte tre kontrollpasienter og en pasient fra BMC gruppen innlegges pga økende hjertesvikt. En person fra BMC gruppen utviklet også et NSTEMI i området for venstre circumflexarterie 4 mnd etter overføringen av BMC i LAD. Pasienten ble behandlet med PCI av venstre circumflexarterie og gjennomførte studien.

Angiografi etter 6 mnd viste ingen forskjell i gjennomsnittlig grad av restenose i stenten blant de to gruppene. Fire pasienter fra kontrollgruppen og syv fra BMC gruppen ble funnet å ha en restenose på over 50 % av arterielumen. En pasient fra kontrollgruppen fikk total okklusjon av stenten. Det ble ikke funnet noen økt forekomst av arytmi i BMC gruppen.

Janssens et al. (Januar 2006)

Dette var den andre kliniske studien av en viss størrelse som ble publisert, og var en randomisert, dobbelblind, placebokontrollert studie med 67 pasienter fordelt på to grupper. Som hovedfunn fant man ingen forbedring av den systoliske funksjon etter 4 måneders oppfølging sammenliknet med placebo-gruppen (29). Som bifunn fant man en signifikant større reduksjon av infarktstørrelsen hos behandlingsgruppen enn hos placebogruppen.

Metode

Pasienter, inklusjon og eksklusjonskriterier

Pasienter ble inkludert dersom de var mellom 18-78 år, hadde hatt et akutt STEMI med en samlet ST- elevasjon på 6mm eller mer som var blitt vellykket behandlet med PCI og innsettelse av stent, og som deretter hadde en signifikant dysfunksjon av venstre ventrikel. Pasienter som tidligere var bypassoperert, hadde lungeødem, kardiogent sjokk eller store komorbiditeter ble ekskludert.

Studiedesign

Ut fra en forventet behandlingseffekt på VVEF på 4- 5 % med et standardavvik på 6,5 ved måling av VVEF på MR, ble det beregnet at det trengtes 34 pasienter i hver gruppe for å oppnå statistisk styrke på 80% ved et tosidig signifikansnivå på 5%.

Pasientene ble randomisert innen første døgn etter reperfusjonen.

MR av hjertet ble utført etter 4 (fra 3-5) dager og etter 4 mnd. Man beregnet VVEF og venstre ventrikkels regionale funksjon, VVEDV, VVESV og vurderte mikrovaskulær obstruksjon, infarktstørrelse, bevegelse og tykkelse av hjerteveggen. Det ble også utført rutinemessig ekkokardiografi av pasientene i tiden mellom gjennomført PCI og før injeksjonen av mononukleære benmargceller (mBMC) eller placebo. Denne målingen bekreftet systolisk dysfunksjon etter at PCI var blitt utført, og før randomiseringen av pasientene, og ga et sant mål på utgangsverdier. Pasientene ble også undersøkt med PET- scan for å beregne blodstrømmen og den oksidative metabolisme i de infarserte områdene.

Cellebehandling

En hematolog høstet benmarg ble fra bakre hoftekam under lokalanestesi, og mBMC ble isolert ved Ficoll density gradient sentrifugering. 4- 6 timer etter innhøstningen ble cellene vasket to

ganger og resuspendert i tre umerkede sprøyter som inneholdt 3,3 ml fysiologisk saltvann tilført 5 % autologt serum. Placeboløsningen bestod av 0,9 % NaCl som inneholdt 5 % autologt serum. Kontrollgruppens BMC ble lagret i en cellebank. Antall kjerneholdige celler i sluttpreparatet ble tellet med et automatisk hemocytometer, og cellenes levedyktighet ble målt med tryptan blue exclusion. Man hadde til sist 10ml celledøsning hvor det med flow cytometer og antistoffer ble kvantifisert de forskjellige typer celler i løsningen.

Celledøsningen og placebo-preparatet ble begge injisert i tre omganger à 2-3 min ved å bruke et perfusjonsskateter (Maverick, Boston Scientific, Natick, MA, USA) i løpet av tre lavtrykks stop-flow oppblåsninger av ballongen. Dette ble gjentatt tre ganger, med en reperfusjonspause på 3 min imellom injeksjonene for å redusere sjansen for iskemi til et minimum. Etter injeksjonen ble det sprøytet inn kontrast i samme infarktrelaterte åre for forsikre at den fungerte normalt. TIMI (thrombolysis in myocardial infarction) frame count ble vurdert før og etter injeksjon.

Endepunkter

Det forhåndsbestemte primære endepunkt med studien var å se etter økning av VVEF målt med MR etter 4 mnd oppfølging. Sekundære endepunkt var å se etter endring fra utgangsverdien i infarktstørrelse og regional funksjon av venstre ventrikel etter 4 mnd oppfølging.

Resultater

Av de 69 pasientene som ble inkludert, ble to tidlig ekskludert og 67 randomisert. En pasient i mBMC- gruppen døde av hemorragisk sjokk mens de resterende 66 fullførte oppfølgingen etter 4 mnd. Det var ingen signifikant forskjell mellom gruppene for utgangskaraktistika. Median tid fra symptomstart til PCI var under 5 timer for begge grupper, og de korrigerte TIMI frame counts var nesten helt like i begge grupper. Grad av venstre ventrikel dysfunksjon etter PCI var sammenlignbar mellom de to gruppene, og verdiene lignet de som er blitt rapportert i tidligere intervensjonsstudier.

Med tanke på celleoverføringen ble cellevolumet som ble hentet fra benmargen (130 ± 22 ml) redusert ved sentrifugering og resuspending til et endelig volum på 10 ml. Dette ble injisert i den infarktrelaterte arterien og inneholdt $304 \pm 128 \times 10^6$ kjerneholdige celler og $172 \pm 72 \times 10^6$ mononukleære celler. FACS- analyse viste $2,8 \pm 1,7 \times 10^6$ CD34+, $2,0 \pm 1,3 \times 10^6$ CD133+, $0,2 \pm 0,15 \times 10^6$ CD90+/Thy-1+, $2,5 \pm 2,0 \times 10^6$ CD105+/endoglin, $7,0 \pm 3,9 \times 10^6$ CD117+/c-kit og $32 \pm 20 \times 10^6$ CD73+ celler. Den gjentatte ballongokklusjonen under injeksjonen av cellene eller placebo-preparatet forverret ikke TIMI frame count eller ga noen økning i utslippet av troponiner.

30 pasienter i hver gruppe ble oppfulgt med MR. VVEF økte i begge grupper etter 4 måneder, men man fant ingen signifikante forskjell på forbedringen av VVEF mellom gruppene (utgangsverdi: $48,5 \pm 7,2\%$ (mBMC) vs $46,9 \pm 8,2\%$ (kontroll); endring: $3,4 \pm 7,9\%$ (mBMC) vs $2,2 \pm 7,3\%$ (kontroll), odds ratio (OR) for behandlingseffekt: 1,036; 95% CI, 0,961-1,118; $P=0,36$). Man fant ingen endringer i VVEDV eller i VVESV over tid. Den manglende effekten av mBMC var uavhengig av tid til PCI, lokalisasjon av infarkt og infarktets størrelse. Mikrovaskulær obstruksjon, som var til stede hos halvparten av pasientene, uavhengig av celleoverføring eller ikke ($n=19$ kontroll, $n=17$ mBMC), reduserte forbedringen i venstre ventrikkelfunksjon og var assosiert med økt remodelering (VVEDV 162 ± 33 ml på dag 4 vs 175 ± 43 ml ved oppfølging, $P=0,014$).

Infarktstørrelsen minket hos kontrollgruppen over tid fra i snitt 22 ± 16 g til 15 ± 9 g, mens den minket signifikant mer etter mBMC behandling, fra i snitt 21 ± 14 g til 10 ± 8 g. Det tilsvarte en behandlingseffekt på 28 % (95% CI, 3 til 47; $P=0,036$). En separat analyse uten de fire pasientene som tidligere hadde hatt akutt koronarsyndrom påvirket ikke forandringene man fant på total venstre ventrikkelfunksjon eller infarktstørrelse etter mBMC overføring.

Det ble også utført omfattende ekkoundersøkelser av venstre ventrikkels regionale funksjon ved kontrollene. Samlet indikerte målingene en viss forbigående effekt av behandlingen på systoliske funksjonsvariabler.

30 kontrollpasienter og 26 mBMC pasienter ble analysert med PET, og man fikk gjort en oppfølgingsanalyse på 28 i kontrollgruppen og 22 i mBMC gruppen. Man fant en økning i myokard gjennomstrømning i begge grupper ($12,3 \pm 11,2\%$ i kontrollgruppen vs $11,5 \pm 10,4\%$ i mBMC gruppen, $P=0,71$). Også metabolismen i infarktomsrådene økte i begge grupper uten at det ble funnet signifikante forskjeller mellom gruppene ($18,4 \pm 8,5\%$ i kontrollgruppen vs $21,0 \pm 12,4\%$ i mBMC gruppen, $P=0,71$). Det var en svak trend mot økt metabolisme etter cellebehandling for pasientene med de største infarktene.

Kliniske hendelser

Med tanke på kliniske utfall, ble det under sykehusoppholdet med Holter- monitorering ikke funnet noen forskjell i behandlingsrelaterte takyarytmier (supraventrikulær arrytm, $n=6$ kontroll og $n=5$ mBMC, ikke- vedvarende VT, $n=3$ kontroll). Det ble ikke oppdaget noen sen- potensialer hos noen av pasientene. En kontrollpasient utviklet en akutt in- stent trombose etter 2 mnd og ble vellykket behandlet med en ny stent. En kontroll- og to mBMC pasienter utviklet tilbakevendende

angina der man måtte dilatere opp en stenose oppstått i stenten. I løpet av oppfølgingen ble en kontrollpasient diagnostisert med lungeadenokarsinom og en mBMC pasient med plateepitelkarsinom i larynx. Begge var storrykere.

ASTAMI-studien (September 2006)

Den tredje kliniske studien i rekken. Dette var en randomisert, kontrollert studie, men den var ikke placebo-kontrollert. 100 pasienter deltok, 50 i mBMC gruppen. Har fant man som hovedfunn ingen signifikante forbedringer av hjertefunksjon, og man så heller ingen større reduksjon av infarktstørrelse etter 6 mnd sammenliknet med kontrollgruppen (30).

Studien var lagt opp for å undersøke om intrakoronar transplantasjon av mBMC forbedrer VVEF etter et akutt hjerteinfarkt behandlet med PCI, vurdert med SPECT. Sekundære mål var å undersøke om behandlingen reduserte VVEDV samt infarktstørrelsen.

Metode

Pasienter, inklusjons og eksklusjonskriterier

100 pasienter ble inkludert og randomisert 1:1. Inklusjonskriteriene var alder mellom 40-75år, STEMI i fremre vegg vellykket behandlet 2-12 timer etter symptomdebut med PCI i LAD proksimalt for den andre diagonale gren, tre eller flere hypokinetiske områder i venstre ventrikel sett på ekkokardiografi, og en CK-MB verdi på mer enn tre ganger øvre referansenivå. Eksklusjonskriteriene var tidligere q-bølgeinfarkt, kardiogent sjokk og alvorlig komorbiditet som forhindret pasienten i å følge behandlingsplanen.

Studiedesign

Dagen PCI ble utført ble satt til dag 0. Mellom dag 3-5 ble pasientene randomisert til mBMC gruppen eller kontrollgruppen. SPECT og ekkokardiografi ble utført på dag 4-7, før mBMC gruppen ble behandlet med mBMC, og dette ble definert som utgangsverdiene. Kontrollgruppen fikk ingen placeboinjeksjon, da det ble vurdert som uetisk å gjøre dette på tiden da studien ble utformet (2003). CK-MB, troponiner og EKG ble tatt dagen før og dagen etter mBMC infusjonen. Under prosedyren ble pasientene overvåket med EKG med standardavledninger, og alt av brystsmerter og arrytmier ble registrert. Alle ble også videre overvåket med telemetri i minst 24 timer.

MR ble først gjort etter 2-3 uker for å unngå at infarktstørrelsen ble overestimert på grunn av ødem. 6 mnd etter infarkt ble ny undersøkelse med SPECT, ekkokardiografi, MR og koronar angiografi gjort. Det ble også utført en klinisk vurdering (av funksjonell status og eventuelle uforutsette hendelser) og blodprøver etter 2-3 uker, 3 og 6 mnd etter infarkt. Alle pasientene fikk medisiner i følge gjeldende retningslinjer, fulgte standard rehabiliteringsprogram for hjerteinfarkt

og fikk generelle råd om kosthold, røyking og livsstilsendringer.

Cellebehandling

Benmarg (50ml i 10,000 IU heparin) ble tatt fra hoftekammen 4- 7 dager etter PCI. Aspiratet ble sentrifugert på en Ficoll density gradient for å isolere de mononukleære cellene, som så ble vasket og resuspendert i 11ml NaCl med 20 % heparinbehandlet plasma. Før cellene ble injisert i kranseåren, ble de filtrert, og det ble utført celletelling og kvalitetskontrollprosedyrer for å teste bakterieforurensning, celle levedyktighet og celleaggregater. Under mBMC injeksjonen brukte man stop-flow teknikk der man tre ganger injiserte en tredjedel (ca 3 ml) av mBMC preparatet og blåste opp ballongen i 90 sekunder for å hindre blodstrøm distalt for lesjonen i LAD, med pauser på 5 min mellom hver gang.

Endepunkter

Det primære endepunktet var å undersøke om mBMC injeksjon ga forbedring av VVEF, målt med SPECT. Av sekundære endepunkt ønsket man å undersøke om behandlingen påvirket infarktstørrelsen, og om man fant en sammenheng mellom en eventuell forbedring av hjertefunksjon og antall celler injisert.

Resultater

Pasienter og bildeundersøkelser

Totalt ble 50 pasienter tatt med i mBMC gruppen og 51 pasienter i kontrollgruppen. En pasient i kontrollgruppen måtte senere ekskluderes på grunn av reinfarkt, kardiogent sjokk og påfølgende hjertetransplantasjon. Man kunne ikke utføre mBMC injeksjon på tre av pasientene i mBMC gruppen (grunnet akutt stenttrombose hos to av pasientene, og lav cellelevedyktighet (89 %) hos én).

6 mnd etter infarkt var alle pasientene fremdeles i live og med i oppfølgingen. SPECT og ekkokardiografi ble utført hos alle pasientene ved målingen av utgangsverdier og etter 6 mnd, men man fikk ikke målt utgangsverdier for volumer med SPECT hos to pasienter på grunn av uregelmessig hjerterytme. MR ble ikke utført på 11 pasienter i uke 2-3 og på 7 pasienter etter 6 mnd fordi det enten forelå kontraindikasjoner eller logistiske hindringer, og dataene fra MR målingen ble heller ikke fullstendige hos en pasient ved måling av utgangsverdi, og hos en etter 6 mnd.

Det var ingen signifikant forskjell i utgangskaraktistika mellom de to gruppene. Gjennomsnittsalder av alle pasientene var 57,4±9,1 år, median tid fra symptomstart til PCI var

210min (interkvartilområde 180 til 330) og medianverdien for maksimum CK-MB verdi var 369 μ g pr liter (interkvartilområde 220 til 444).

Den intrakoronare injeksjonen ble utført på 6 dager (interkvartilområde 5 til 6) etter PCI. Benmarg ble aspirert dagen før hos 43 pasienter og på samme dag hos 4 pasienter. Median antall injiserte mononukleære celler var 68×10^6 (interkvartilområde 54×10^6 til 130×10^6), median prosent levedyktige celler var 95 % (interkvartilområde 94 til 97) og median antall CD34+ celler var $0,7 \times 10^6$ (interkvartilområde $0,4 \times 10^6$ til $1,6 \times 10^6$). benmargaspirering og preparering ble gjentatt hos en pasient på grunn av lav celle levedyktighet og hos en annen pasient fordi det ble funnet forurensning i preparatet. Av de 47 pasientene som fikk injisert mBMC, fikk 34 milde bryst smerter og 36 hadde forbigående iskemiske ST forandringer under tiden ballongen var oppblåst. Ingen pasienter fikk nytt infarkt som følge av prosedyren.

Utgangsverdier målt med SPECT ble tatt etter $4,0 \pm 1,4$ dager, med ekkokardiografi etter $4,5 \pm 1,1$ dager og med MR etter $18,8 \pm 4,3$ dager etter infarkt. Det var ingen signifikant forskjell mellom gruppene i utgangsverdiene. Med SPECT ble utgangsverdiene av VVEF $41,3 \pm 10,4\%$ (mBMC) vs $42,6 \pm 11,7$ (kontroll), $P=0,57$, av VVEDV $162,3 \pm 59,1$ ml (mBMC) vs $148,0 \pm 46,3$ ml (kontroll), $P=0,19$ og av infarktstørrelse $43,8 \pm 17,4\%$ (mBMC) vs $38,3 \pm 21,1\%$ (kontroll), $P=0,16$.

Det ble ikke funnet signifikante forskjeller mellom de to gruppene på disse parameterne etter 6 mnd målt med SPECT og ekkokardiografi, eller ved MR målingen etter 2-3 uker. Etter 6 måneder fikk man disse SPECT verdiene: VVEF $49,3 \pm 13,2\%$ (mBMC) vs $49,3 \pm 11,0\%$ (kontroll), VVEDV $151,1 \pm 52,9$ ml (mBMC) vs $146,0 \pm 50,0$ ml (kontroll), infarktstørrelse $32,8 \pm 20,4\%$ (mBMC) vs $30,5 \pm 20,9\%$ (kontroll). Behandlingseffekt ble for VVEF $0,6\%$ (95% CI, -3,4 til 4,6; $P=0,77$), for VVEDV -7,0 (95% CI, -18,0 til 4,0; $P=0,21$), og for infarktstørrelse -2,8% (95% CI, -7,1 til 1,6; $P=0,21$).

For mBMC gruppen så man ingen signifikant korrelasjon mellom økningen av VVEF og antall mononukleære celler injisert ($r=0,03$, $P=0,82$), tiden fra PCI til mBMC injeksjonen ($r=-0,01$, $P=0,97$) eller pasientens alder ($r=0,02$, $P=0,88$).

Kliniske hendelser

Forurensning av cellepreparatet med koagulase negative stafylokokker ble funnet hos én pasient. To pasienter i mBMC gruppen hadde stent trombose i akutfasen og fikk lagt inn ny stent istedenfor mBMC injeksjon. Det ble bekreftet et nytt infarkt hos en av disse pasientene, som senere også ble behandlet med PCI i høyre kransearterie på dag 27 på grunn av ustabil angina. I løpet av oppfølgingsperioden på 6 måneder ble PCI utført på en pasient i kontrollgruppen på grunn av restenose i samme område, og en pasient i hver gruppe måtte bypass opereres.

Etter at SPECT, ekkokardiorafi og MR var blitt gjort etter 6 måneder, ble det gjort koronar angiografi ifølge standard retningslinjer, noe som resulterte i at 8 pasienter i hver gruppe fikk utført ny PCI på grunn av restenose i samme område og at to pasienter i mBMC gruppen og en i kontrollgruppen måtte bypassopereres.

En pasient i hver gruppe måtte reinnlegges på grunn av progressiv hjertesvikt. I mBMC gruppen fikk en pasient vedvarende ventrikulær takykardi før mBMC injeksjonen og en fikk ventrikkelflimmer dag 6, 24 timer etter injeksjon. Begge kom seg uten sekveler etter vellykket resuscitering og fikk implantert en ICD (implanterbar hjertedefibrillator) som ikke utleverte flere støt i oppfølgingsperioden. I kontrollgruppen fikk en pasient på dag 2 pulsløs ventrikulær takykardi, men denne ble konvertert til sinusrytme igjen ved et prekordialt slag. En pasient i mBMC gruppen fikk diagnostisert lungekreft. Retrospektivt ble denne tumor også sett på røntgen thorax tatt før mBMC ble gitt. Fire pasienter i mBMC gruppen og seks i kontrollgruppen ble rehospitalisert av andre grunner.

REPAIR-AMI studien (September 2006)

Dette var en dobbelt blind, placebokontrollert, randomisert studie med 204 pasienter med akutt hjerteinfarkt. REPAIR-AMI er pr i dag den største studien innen dette feltet. Man injiserte enten mBMC eller placebo. Pasientene ble fulgt først i 4 måneder for ny kontroll, deretter videre i ett år. Man fant en signifikant bedring av VVEF etter 4 måneder sammenlignet med placebogruppen (31).

Et interessant bifunn var at man kun fikk signifikant effekt hos pasientene i mBMC gruppen som fikk infusjonen 5 dager eller senere etter PCI, og hos de med lav utgangsverdi av EF. Etter ett år var det signifikant færre tilfeller av det kombinerte endepunktet død, forekomst av nye infarkter og behov for nye revaskulariseringsprosedyrer i mBMC gruppen i forhold til placebo gruppen.

Metode

Pasienter, inklusjon og eksklusjonskriterier

Pasienter i alderen 18-80 år kunne delta dersom de hadde hatt et akutt STEMI som hadde blitt vellykket behandlet med PCI med stentinnleggelse, og som hadde en betydelig redusert venstre ventrikkelfunksjon ($EF \leq 45\%$ ifølge visuelt estimat).

Studiedesign

Det ble aspirert benmarg av alle pasientene 3-6 dager etter PCI. Aspiratet ble sendt til et sentralt celleprosesseringslaboratorium hvor pasientene ble randomisert til enten å få tilbake mBMC eller et placebopreparat. Utgangsverdiene av venstre ventrikkelfunksjon ble målt med angiografi i samme seanse som da man injiserte mBMC/placebopreparatet, og målingene ble repetert etter 4 måneders oppfølging.

Angiogram av venstre ventrikkelfunksjon ble tatt med en standardprojeksjon ved målingen av utgangsverdiene (rett før mBMC infusjonen) og ved 4 månederskontrollen. En erfaren operatør i et sentralisert laboratorium utførte målingene, og var uvitende om hvilken gruppe pasientene befant seg i. Venstre ventrikkels volumer og derav VVEF ble målt med areal-lengde metoden, og veggbevegelsen i infarktområdet ble bestemt med senter- linje metoden.

Cellebehandling

Man aspirerte 50 ml benmarg i heparinbehandlede sprøyter fra hofteammen under lokalanestesi. Det ble også tatt 20 ml veneblod for å produsere pasientens eget serum. mBMC ble

isolert ved å bruke Ficoll density gradient sentrifugering. Cellepreparatet bestod som i de andre studiene av en heterogen celleblanding av hematopoietiske- og mesenchymale- stamceller og andre mononukleære celler. Cellene ble resuspendert i 10 ml X VIVO 10 medium som inneholdt 2 ml av pasientens eget serum. Placebopreparatet bestod av det samme, men selvfølgelig uten celler.

I forbindelse med injeksjonene av mBMC / placebo, fikk alle pasientene 7500 til 10,000 enheter heparin, og de 85 første fikk abciximab (0,25 mg/kg). mBMC ble infusert ved bruk av stop-flow teknikk, med et ballongkateter plassert inne i segmentet som inneholdt stenten, hvor man tre ganger injiserte en tredjedel (ca 3,3 ml) av mBMC preparatet og blåste opp ballongen i 3min for å hindre blodstrøm distalt for lesjonen i LAD, med pauser på 3 min mellom hver gang. Etter prosedyren ble koronar angiografi gjentatt for å sikre at koronarkarene fremdeles var åpne.

Endepunkter

Det primære endepunkt var absolutt endring i VVEF fra utgangsverdi etter 4 måneder, målt med kvantitativ angiografi av venstre ventrikkel. Sekundære endepunkt inkluderte endringer i VVESV, VVEDV og endringer i bevegelsen av hjerteveggen. Forhåndsdefinerte undergruppeanalyser ble også gjort for å bestemme om det fantes en sammenheng mellom det primære endepunktet og utgangsverdi av VVEF samt tiden fra symptomstart til PCI behandling. Forhåndsdefinerte kliniske endepunkt inkluderte større alvorlige hendelser (død, nytt infarkt eller ny revaskularisering) og reinnleggelse pga hjertesvikt. Andre kliniske hendelser og endepunkter ble analysert post hoc. Bare den første hendelsen hos hver pasient ble inkludert i analysen.

Resultater

Pasienter og utgangsverdier

Totalt 217 pasienter med akutt STEMI og vellykket PCI behandling ble inkludert i studien, men 13 ble av ulike årsaker ekskludert før man aspirerte benmarg. Av de gjenværende ble 103 randomisert til placebogruppen og 101 til mBMC gruppen. De to gruppene lignet godt med hensyn til utgangsverdier og hva slags prosedyrer som ble utført med PCI, samt i den medikamentelle behandlingen i løpet av studien.

Prosedyreresultater av infusjonen

Gjennomsnittlig antall mBMC injisert var $236 \pm 174 \times 10^6$. Etter benmargaspirasjonen trakk en pasient seg og en ble ekskludert på grunn av feber og en økning av CRP. Det var ingen blødningskomplikasjoner etter benmargaspirasjonen. Den intrakoronare infusjonen var vellykket

hos alle i mBMC gruppen. I placebogruppen ble infusjonen ikke utført på tre pasienter: Hos en fikk man ikke ført guidewiren inn til det infarktberørte området, en fikk en luftemboli under angiografien før guidewiren kunne føres videre inn, og en fikk ved angiografien påvist en trombe i en annen arterie, ikke relatert til infarkt.

Målinger av venstre ventrikkelfunksjon

Det var ingen signifikante forskjeller i utgangsverdiene av venstre ventrikkels funksjon og volumer mellom de to gruppene. Etter 4 måneder fikk man utført tilfredsstillende paret angiogram for kvantitativ analyse av venstre ventrikkel hos 95 av mBMC pasientene og 92 i placebogruppen. Av pasientene man ikke fikk utført paret angiografi på, var to døde, fem (tre i placebogruppen, to i mBMC gruppen) nektet angiografi ved oppfølgingen, tre møtte ikke på en av angiografitimene (to i placebogruppen, en i mBMC gruppen) og en pasient i placebogruppen hadde en trombe i venstre ventrikkel. I tillegg var det hos en av pasientene i hver gruppe for dårlig billedkvalitet til at de kunne analyseres.

VVEF økte fra et gjennomsnitt på $46,9 \pm 10,4\%$ i utgangsverdi til $49,9\% \pm 13\%$ etter 4 måneder i placebogruppen. I mBMC gruppen økte VVEF fra en utgangsverdi på $48,3 \pm 9,2\%$ til $53,8 \pm 10,2\%$. Den absolutte økningen i VVEF var signifikant høyere i mBMC gruppen enn hos placebogruppen (behandlingseffekt $2,5\%$; 95% CI, 0,5 til 4,5; $P=0,01$).

Ved analyse av infarktsonen fant man at den regionale kontraktilitet viste en signifikant større forbedring hos mBMC gruppen enn hos placebogruppen. VVEDV økte litt i begge grupper. VVESV holdt seg derimot uendret i mBMC gruppen mens det økte i placebogruppen, og dette var en signifikant forskjell mellom gruppene.

Sammenheng mellom endring i VVEF og både utgangsverdi av VVEF og infusjonstidspunkt.

Det var et signifikant inverst forhold mellom utgangsverdien i VVEF og absolutt endring i VVEF etter 4 måneder i mBMC gruppen ($r=-0,21$, $P=0,04$), men ikke i placebogruppen ($r=+0,11$, $P=0,31$). Da man fordelte hele pasientpopulasjonen i forhold til medianverdien av VVEF fant man en signifikant sammenheng mellom behandlingseffekt av mBMC infusjonen og utgangsverdien av VVEF. Blant pasientene med en utgangsverdi av VVEF på mindre eller lik medianverdien ($48,9\%$), så man at pasientene i mBMC gruppen hadde en absolutt økning i VVEF som var tre ganger større enn i placebogruppen: $7,5 \pm 7,1\%$ sammenlignet med $2,5 \pm 7,7\%$ (absolutt forskjell, $5,0\%$; 95% CI, 2,0 til 8,1, $P=0,02$). Hos pasientene med en utgangsverdi av VVEF over medianverdien, var det ingen signifikant forskjell mellom gruppene for endringen i VVEF.

Ved å korrelere absolutt endring i VVEF etter 4 måneder med tiden fra PCI til infusjonen av

mBMC eller placebo-preparatet fant man en signifikant sammenheng, med en progressiv økning i den mBMC relaterte bedringen av den kontraktile funksjonen desto større intervallet mellom PCI og mBMC injeksjonen ble ($P=0,01$). Faktisk så man bare effekt av mBMC infusjonen på bedringen av den kontraktile funksjonen hos pasientene som fikk infusjon mer enn 4 dager etter PCI. Ved mBMC infusjon på dag 5 eller senere var det en behandlingseffekt på VVEF på 5,1% (95% CI, 1,7 til 8,5; absolutt økning i VVEF $1,9 \pm 7,6\%$ i placebo-gruppen vs. $7,0 \pm 7,7\%$ i mBMC gruppen; $P=0,004$). Det var ingen signifikant behandlingseffekt hos pasientene som hadde fått infusjonen opptil dag 4 etter PCI.

Kliniske hendelser

Av de enkelte alvorlige kardielle hendelsene død, nye hjerteinfarkt og reinnleggelse på grunn av hjertesvikt var det ingen signifikant forskjell mellom de to gruppene etter 4 måneder. Forekomsten av det post hoc kombinerte kliniske endepunktene av død, nye hjerteinfarkt og reinnleggelse på grunn av hjertesvikt var signifikant mindre i mBMC gruppen enn i placebo-gruppen (2 vs 12 pasienter, $P=0,03$).

REGENT-studien (Januar 2009)

Denne studien kom ut i januar i år og er foreløpig den siste i rekken. Dette var en randomisert studie med 200 pasienter som ble delt i tre grupper, en gruppe som fikk infusjon av uselekterte mBMC, en som fikk selekterte CD34+CXCR4+ celler (SEL) og en kontrollgruppe som ikke fikk noen celleterapi. Hovedfunnet var at man ikke fant signifikante forskjeller mellom de tre gruppene (32).

Metode

Pasienter

Studien bestod av 200 pasienter med akutt STEMI behandlet med PCI. Inklusjonskriteriene var: akutt fremreveggsinfarkt, vellykket PCI behandling med stentinnleggelse i LAD innen 12 timer etter symptomdebut, redusert VVEF $\leq 40\%$ målt med ekkokardiografi og alder mellom 18 og 75 år. Eksklusjonskriterier var tidligere infarkt, store stenoser i andre koronarkar som ville trenge revaskulering, kardiogent sjokk, nyresvikt, tidligere eller manifest kreft, graviditet, amming eller kontraindikasjoner mot MR. Alle pasientene fikk medikamentell behandling som anbefalt i gjeldende retningslinjer.

Studiedesign

REGENT studien var en multisenter, randomisert, prospektiv studie. Inkluderte pasienter ble sortert i et 2:2:1 forhold i tre parallelle grupper: de som ble aktivt behandlet med infusjon av enten SEL (n=80) eller mBMC (n=80), og en kontrollgruppe som ikke fikk celleterapi (n=40). Det ble heller ikke foretatt benmargaspirasjon av kontrollpasientene. Ekkokardiografi ble brukt for å kvalifisere pasientene mht redusert VVEF, mens MR og angiografi ble brukt til målingene av venstre ventrikkels funksjon. Venstre ventrikkel angiografi, med høyre, fremre, skrå projeksjon ble kun utført på behandlingsgruppene, i samme seanse som celleinfusjonen. MR ble brukt i alle gruppene for å vurdere VVEF, VVESV og VVEDV, 1-3 dager etter celleoverføringen. Begge undersøkelser ble gjentatt etter 6 måneder i behandlingsgruppen, mens man kun gjorde MR etter 6 måneder hos kontrollpasientene.

Cellebehandling

Fra pasientene i behandlingsgruppene aspirerte man benmarg (100-120 ml hos SEL-pasientene og 50-70 ml hos mBMC pasientene) fra bakre øvre hoftekam under kort, intravenøs

generell anestesi. Dette ble gjort 7 (3 til 12) dager etter PCI. mBMC ble isolert ved å bruke Ficoll density gradient sentrifugering. Median celletall ble $1,78 \times 10^8$. Hos pasientene som mottok CD34+CXCR4+ celler, ble cellene etter Ficoll isoleringen videre isolert ved en to-steps immunomagnetisk selektering med monoklonale antistoffer koblet med magnetiske anheng og MidiMACS System. Median antall CD34+CXCR4+ celler man fikk var $1,90 \times 10^6$. mBMC ble resuspendert i forsfatbufret fysiologisk saltvann (sluttvolum 10ml) og overført samme dag til kateteriseringslaboratoriet for å infuseres.

Celleoverføringen ble utført ved bruk av stop-flow teknikk, med et ballongkateter plassert inne i segmentet som inneholdt stenten, hvor man tre ganger injiserte en tredjedel (ca 3,3 ml) av mBMC preparatet og blåste opp ballongen i 3min for å hindre blodstrøm distalt for lesjonen i LAD, med pauser på 3 min mellom hver gang. Etter prosedyren ble koronar angiografi gjentatt for å sikre at koronarkarene fremdeles var åpne

Endepunkter

Det primære endepunkt var absolutt endring i VVEF målt med MR ved utgangsmåling og 6 måneder etter celleinfusjonen. De sekundære endepunkt var: endringer i venstre ventrikkelvolum målt med MR, og endringer i VVEF målt med venstre ventrikkel angiografi. Med tanke på sikkerhet hadde man med endepunkt som inkluderte større alvorlige kardiovaskulære hendelser (død, nytt infarkt, slag og revaskularisering). Andre forhåndsdefinerte analyser var å undersøke om man fant sammenheng mellom utgangsverdi i VVEF, tid fra symptomdebut til PCI, tid fra PCI til celleinfusjon og antall celler overført med endringene i VVEF. Dessuten ønsket man å identifisere de faktorer som var assosiert med klinisk signifikant forbedring av VVEF, definert her som en absolutt økning av VVEF på $\geq 5\%$.

Resultater

Pasientfordeling og prosedyresikkerhet

Det var ingen signifikant forskjell mellom gruppene med hensyn til utgangskaraktistika. Den intrakoronare mBMC overføringen ble vellykket utført uten komplikasjoner hos alle pasientene som var randomisert til de to behandlingsgruppene (BMC gruppene). En pasient utviklet en arteriovenøs fistel i femoralarterien etter prosedyren og måtte få kirurgisk behandling.

VVEF og volumer

Resultater fra paret MR av venstre ventrikkel var tilgjengelig hos 117 pasienter (20 fra

kontrollgruppen, 46 fra mBMC gruppen og 77 fra SEL gruppen). Resultater av paret angiografi av venstre ventrikkel var tilgjengelig hos 152 pasienter fra BMC gruppene (75 fra mBMC gruppen og 77 fra SEL gruppen). Det var ingen signifikante forskjeller for utgangsverdiene i VVEF og venstre ventrikkelvolum mellom gruppene.

Etter 6 måneder så man med MR målingene en økning i VVEF sammenlignet med utgangsverdiene hos pasientene i BMC gruppene. VVEF økte fra 37% (19-44) til 40% (24-57) hos pasientene i mBMC gruppen og fra 35% (12-45) til 38% (17-77) i SEL gruppen. Det var ingen endring i VVEF i kontrollgruppen, som var 39% (23-44) i utgangsverdi og 39% (32-58) etter 6 måneder. Som hovedfunn fant man ingen signifikant forskjell mellom BMC gruppene og kontrollgruppen når man sammenlignet de absolutte endringer i VVEF.

Da venstre ventrikkel angiografi ikke ble utført på kontrollpasientene, fikk man her bare sammenlignet resultatene for de to BMC gruppene. Som med MR så man også en økning i VVEF etter 6 måneder i begge BMC gruppene. Forskjellen i de absolutte endringene mellom de to gruppene var ikke signifikante.

Etter 6 måneder var det ingen signifikante endringer i VVESV eller VVEDV i verken kontrollgruppen eller i BMC gruppene. VVESV gikk fra 87ml (72-125) til 96ml (54-116) i kontrollgruppen ($P=0,68$), fra 92ml (53-162) til 91ml (45-174) i mBMC gruppen ($P=0,61$) og fra 101ml (58-196) til 112ml (32-236) i SEL gruppen. Når det kom til verdiene av VVEDV, var det lagt ut ufullstendige data i supplementet, men sammenligning av absolutte endringer i VVESV og VVEDV skal ikke ha vist signifikante forskjeller mellom gruppene.

Faktorer assosiert med forbedring av VVEF

Forhåndsdefinerte analyser ble utført for å identifisere faktorer som kan predikere klinisk signifikant forbedring av VVEF ($\Delta \geq 5\%$). Det var en signifikant invers korrelasjon mellom utgangsverdien av VVEF og endringen etter mBMC behandling ($R = -0,5$; $P = 0,0008$) hos SEL pasientene, men ikke hos mBMC pasientene ($R = -0,26$; $P = 0,13$) eller kontrollgruppen ($R = -0,11$; $P = 0,7$). Pasientene ble delt etter utgangsverdien av VVEF over eller under medianverdien på 37%. Man fant da en signifikant forbedring i VVEF hos pasientene i begge BMC gruppene som hadde en utgangsverdi i VVEF under medianverdien, men ikke hos pasientene med utgangsverdi i VVEF \geq medianverdien. Man fant ingen slik sammenheng i kontrollgruppen. Univariat analyse viste at en utgangsverdi av VVEF under medianverdien var en prediktor for signifikant forbedring av VVEF etter 6 måneder i begge BMC gruppene, men ikke i kontrollgruppen. I multivariat logistisk regresjon fant man to variabler, utgangsverdi av VVEF under medianverdien og tid fra symptomdebut til PCI \geq medianverdien som signifikante prediktorer for forbedring av VVEF i

begge BMC gruppene.

Kliniske hendelser

Tre pasienter døde, en i hver gruppe. To pasienter i kontrollgruppen og en i SEL gruppen utviklet et nytt infarkt. Det var ingen signifikante forskjeller i hyppigheten av alvorlige kardiovaskulære hendelser eller i det samlede endepunktet for død, reinfarsing, slag og revaskularisering mellom gruppene. Syv pasienter i kontrollgruppen, 13 i mBMC gruppen og 12 i SEL gruppen måtte revaskulariseres på ny i samme arterie.

Oversiktstabell over studiene:

	n=	Placebo	Dose (x10 ⁸)	EF utgangsverdi	Endring i EF	Beh. Effekt (%)	P	Andre effekter
BOOST	Total: 60 Kontroll: 30 BMC: 30	Nei	24,6±9,4	Kontroll 51,3±9,3 % BMC: 50,0±10,0 %	0,7±8,1 % 6,7±6,5 %	6,0 (2,2 til 9,9)	0,0026	
Janssens	Total: 67 Kontroll: 34 mBMC: 33	Ja	3,04±1,28	Placebo: 46,9±8,2 % mBMC: 48,5±7,2 %	2,2±7,3 % 3,4±6,9 %	1,04 (0,96 til 1,12)	0,36	Reduksjon av infarktstørrelse (P=0,036)
ASTAMI	Total: 100 Kontroll: 50 BMC: 50	Nei	0,68 (0,54-1,30)	Kontroll 42,6±11,7 % mBMC: 41,3±10,4 %	7,0±9,6 % 8,1±11,2 %	0,6 (-3,4 til 4,6)	0,77	
REPAIR-AMI	Total: 204 Placebo: 103 mBMC: 101	Ja	2,36±1,74	Placebo: 46,9±10,4 % mBMC: 48,3±9,2 %	3,0±6,5 % 5,5±7,3 %	2,5 (0,5 til 4,5)	0,01	Best effekt ved infusjon ≥ 5 dager og ved EF ≤ medianverdien
REGENT*	Total: 200 Kontroll: 40 SEL: 80 mBMC: 80	nei	1,78	Kontroll 39 (23- 44) % SEL: 35 (12- 45) % mBMC: 37 (19- 44) %	0 % 3 % 3 %	— 3 % 3 %	Ikke publisert, men ikke signifikant	

Tabell: Tallene viser resultatene fra det primære endepunkt i studiene (beh. effekt på EF). Tallene etterfulgt av ± er gjennomsnittsverdier med SD. Tallene etterfulgt av () er medianverdien, etterfulgt av interkvartilområdet * En del verdier oppgitt uten standardavvik/ interkvartilområder.

Diskusjon

Som vi har sett i de fem studiene over, har man kommet fram til forskjellige resultater, men over det hele kan det synes som det er en positiv trend hos samtlige. Jeg skal her forsøke å samle dette i en mer sammenfattende og lettlest vurdering. I tillegg finnes det flere metaanalyser over slike kliniske studier. Jeg kommer til å bruke de to sist publiserte, Abdel-Latif et al. (33) og Martin-Rendon et al. (34) til å supplere egne funn og vurderinger. Disse to har i tillegg tatt for seg flere langt mindre studier der både forskjellige metoder og primære endepunkt er brukt. Derfor kan ikke funnene deres tillegges betydelig vekt, men samlet kan de i det minste gi et visst inntrykk på hvilken retning resultatene fører.

VVEF var det primære endepunkt i alle fem studiene. Ingen av studiene har kunnet vise til noe betydelig behandlingseffekt, men to av dem har klart å fremvise en liten, men signifikant forskjell mellom gruppene de første månedene. Av signifikant forbedring hadde bare BOOST studien bedring etter 6 måneder og REPAIR etter 4 måneder. Man fant en signifikant bedring av VVEF over kontrollene i metaanalysene av både Abdel-Latif et al.(33) (samlet forskjell 3,66%; 95% CI, 1,93% til 5,40%; $P < 0,001$) og Martin-Rendon et al. (34) (samlet forskjell 2,99%; 95% CI, 1,26-4,72%; $P = 0,0007$).

Ved nye målinger etter 18 mnd i BOOST studien fant man derimot ikke lenger en signifikant forbedring av behandlingen. Verken Janssens et al, ASTAMI- og REGENT studien fant noen signifikant forskjell mellom gruppene etter 4 (Janssens) og 6 måneder (ASTAMI og REGENT). Når det gjelder REPAIR studien, som også kunne vise til best resultater, er studien blitt kritisert for å ha brukt en unøyaktig metode for å måle VVEF (monoplan venstre ventrikkel ventrikulografi) (35), så resultatene her må tolkes med en viss usikkerhet.

Samlet ut fra resultatene ovenfor ser det ut til at BMC behandling har en liten til moderat effekt på VVEF. Om denne beskjedne effekten er klinisk signifikant er mer usikkert. Resultatene fra BOOST studien indikerer at BMC behandling har en forbigående effekt, men det kan man kun spekulere i inntil flere og større studier foreligger. Om behandlingen har en langtidseffekt på VVEF eller øker overlevelse på lang sikt gjenstår å se. Dataene fra REPAIR-AMI studien etter 12 måneder indikerer at det kan være en effekt også på kliniske endepunkter. Studien hadde imidlertid ikke statistisk styrke til å se på slike forskjeller, slik at disse resultatene må tolkes med forsiktighet.

Et annet parameter som i flere studier er brukt som sekundært endepunkt, er infarktstørrelse. Blant de fem gjennomgåtte studiene over er det bare Janssen`s et al. som fant signifikant mindre infarktstørrelse i BMC gruppen etter 4 måneder. ASTAMI studien og BOOST studien (ved late

contrast enhancement) fant derimot ingen forskjell i infarktstørrelsen mellom gruppene. REPAIR- og REGENT studien brukte ikke infarktstørrelse som parameter.

Ut fra resultatene fra de fem gjennomgåtte studiene i denne oppgaven blir resultatene sprikende, og det er vanskelig å si om det er noen effekt av BMC behandling på infarktstørrelse. Derimot er det blitt konkludert med at infarktstørrelsen er blitt signifikant mindre i behandlingsgruppene i både Abdel-Latif et al. (-5,49%; 95% CI, -9,10 % til 1,88%; P=0,03) og i Martin-Rendon et al. (-3,51%; 95%CI, -5,91% til -1,11%; P=0,004) (33, 34). Selv om disse metaanalysene har en større statistisk tyngde enn de fem overnevnte studier alene, har de inkludert mange studier som er gjort i mindre skala og uten randomiserte kontrollgrupper, så disse resultatene er usikre. Sett over ett vil jeg si at disse resultatene indikerer at BMC behandling reduserer infarktstørrelse. Dette trenger uansett å studeres mer før man kan si noe sikkert.

Ingen av studiene fant at BMC behandling reduserte VVEDV, som er det mest brukte mål på remodelering i klinikken. Heller ikke i metanalysene av Abdel-Latif et al. og Martin-Rendon et al. kunne man vise til signifikant endring i VVEDV (33, 34). Det ser derfor ikke ut til at BMC behandling har noen effekt på VVEDV, og dermed sannsynligvis heller ikke på remodelering.

Et interessant funn i REPAIR studien er at man fant en signifikant sammenheng mellom behandlingseffekten av mBMC og timingen av infusjonen, med en signifikant absolutt bedring av VVEF hos pasientene som fikk infusjonen 5 dager eller senere etter PCI i mBMC gruppen. I metaanalysen av Martin-Rendon et al. (34) så man også en signifikant forbedring av VVEF når BMC ble infusert etter mer enn 7 dager.

Det kan tenkes at denne økte effekten ved senere administrasjon kan skyldes at det i myokardet de første dagene etter et hjerteinfarkt på grunn av celledød og vevsødem fremdeles er et for fiendtlig miljø for at stamcellene kan slå seg ned og vokse skikkelig. Eksperimentielle studier tyder derimot på at tidlig behandling med mBMC (<24t) er gunstig. Dette er foreløpig upubliserte data (Lunde, pers. kommunikasjon). Uansett trengs det flere kliniske forsøk som er bevisste på tidsaspektet for BMC infusjonen før man kan si noe sikkert om gunstigste tidspunkt for BMC behandling.

I REPAIR og REGENT studien fant man en annen sammenheng som kan være interessant å undersøke næyere. Man fant at pasientene som hadde en utgangsverdi av VVEF som lå under medianverdien hadde en signifikant bedre effekt av behandling enn pasientene som lå over medianen. Dette kan være et resultat av det statistiske fenomenet ”regression to the mean”, men det er uansett et klinisk viktig poeng, som det blir spennende å belyse grundigere i fremtidige studier.

Det er jo pasientene med mest alvorlig pumpesvikt som har størst behov for behandling som kan bedre funksjonen.

I metaanalysen av Martin-Rendon et al. fant man at behandlingseffekt på VVEF korrelerte positivt med økende antall BMC infusert, og man så at funnene tyder på at man får signifikant effekt på VVEF bare dersom celleantallet var høyere enn 10^8 celler. Derimot fant ikke Abdel-Latif en slik sammenheng, til tross for å ha analysert mange av de samme studiene som Martin-Rendon et al.(31). Man ser at bl.a. det høye celletallet i BOOST studien bidrar til at funnet i Martin-Rendon et al. går i positiv retning av mange celler. Det er da viktig å være klar over at det i BOOST studien ble det brukt en annen prosedyre for å isolere celler enn i de andre studiene. Ved gelatin sedimentasjon får man med alle kjerneholdige celler i sluttproduktet, også de flerkjernede cellene. Dette i motsetning til density gradient sentrifugering på Ficoll som har vært brukt i de andre studiene, der man kun får med de mononukleære cellen og dermed oppnår langt lavere celletall. Det betyr at celletallene i BOOST ikke kan ansees som direkte sammenlignbare med de andre studiene. Sett over ett bør det derfor stilles spørsmål ved om man kan legge vekt på funnet i Martin-Rendon et al.

Etter å ha sett på median antall celler infusert i de fem studiene tatt for seg i denne oppgaven, ser man at det kun er ASTAMI studien som ga mindre enn 10^8 celler. Det kan tenkes at dette kan ha vært et mulig bidrag til at man ikke fant signifikante behandlingsforskjeller i studien, men det er blitt vist behandlingseffekt i andre studier med lignende celletall, så sannsynligvis finnes det andre faktorer av større betydning for resultatet.

En svakhet med studiene som er utført så langt, er at oppfølgingstiden har vært kort, bare halvannet år på det lengste, de fleste rundt et halvt år. Dersom man skal kunne konkludere med mer permanente effekter av behandlingen, trengs det helst mange års oppfølging. Dette er ressurskrevende, og siden studiene på dette feltet fikk sin oppstart for kun få år siden gjenstår det å få resultater som forteller noe om langtidseffekt

Når det kommer til hvilke celler og virkningsmekanismer som kan forårsake en forbedring av hjertefunksjonen, vet man fremdeles lite. mBMC som injiseres er en heterogen populasjon, og man har ennå ikke klart å finne en celletype som skiller seg ut. Det er vist at nivået av sirkulerende CD34+ endoteliale progenitorceller er prediktivt for senere kardiovaskulære hendelser (36), så det kan tenkes at CD 34+ celler tatt fra benmarg kan være viktige for reparasjonen av skadet myokard (37). Det er også usikkert hva slags mekanismer som ligger til grunn for en eventuell forbedring av hjertefunksjonen ved mBMC behandling (38). Det er for eksempel satt spørsmål ved

benmargtamscellenes evne til å transdifferensiere til nye kardiomyocytter (25, 26). CD34+ cellene utgjør kun 1-2 % av de mononukleære benmargcellene (39), og ekte benmarg stamceller er enda sjeldnere (40). Etter intrakoronar injeksjon av mBMC forblir bare en liten andel av cellene i hjertet (41), og en stor andel dør også i løpet av få dager (42). Hvor mange av de injiserte cellene som faktisk blir igjen i hjertet og utøver effekt er derfor noe vi enn så lenge vet lite om. Dette er faktorer man er blitt klar over etter at de kliniske studiene ble startet, og disse begrensningene forklarer nok til en stor grad hvorfor man kun har oppnådd en beskjeden effekt i de kliniske studiene. En trenger altså å identifisere cellene som har en regenerativ effekt, man trenger teknikker for å få levert tilstrekkelig antall celler, og en trenger metoder som gjør at cellene blir værende i hjertet. Det er ikke før en har løst disse problemene at man kan realisere den potensielle effekten av cellebehandling.

Sett over ett tolker jeg resultatene fra de hittil publiserte artikler som lovende. Prosedyren virker trygg, og ingen av de store studiene har rapportert om økt risiko for pasientene, snarere tvert imot i flere tilfeller. Selv om det er en betydelig heterogenitet i resultatene, ser man likevel en trend mot en positiv behandlingseffekt på hjertefunksjonen, om enn på det beste bare av moderat grad. Dette er fremdeles forskning på et relativt tidlig stadium, og det trengs ennå mye basalforskning før vi kan gjøre cellebehandling mer effektiv. Metodene for måling av behandlingseffekt har også vært varierende, men det begynner å komme mer entydige prosedyrer i studiene, slik at fremtidige studiers resultater nok kan bli lettere å sammenligne med hverandre. Flere og større kliniske forsøk er nødvendig før man kan si om cellebehandling etter hjerteinfarkt kommer til å bli etablert i den kliniske rutinen. Dette er et relativt nytt felt innen medisinen som ikke må overses, og det blir spennende å følge med videre.

Referanser

1. Linzbach AJ. Heart failure from the point of quantitative anatomy. *Am J Cardiol*. 1960;5:370-82
2. Beltrami AP, Urbanek K, Kajstura J, et al. Evidence that human cardiomyocytes divide after myocardial infarction. *N Engl J Med*. 2001;344:1750-7
3. Nadal-Ginard B, Kajstura J, Leri A, et al. Myocyte death, growth and regeneration in cardiac hypertrophy and failure. *Circ Res*. 2003;92:139-50.
4. Urbanek K, Quaini F, Tasca G, et al. Intense myocyte formation from cardiac stem cells in human cardiac hypertrophy. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003;100:10440-5
5. Mallory GK, White PD, Salcedo-Salgar J. The speed of healing of myocardial infarction: A study of the pathologic anatomy in 72 cases. *Am Heart J*. 1939;18:647-71
6. Pfeffer ME, Braunwald E. Ventricular remodelling after myocardial infarction. Experimental observations and clinical implications. *Circulation*. 1990;81:1161-72.
7. Menasche P, Hegege AA, Vilquin JT, et al. Autologous skeletal myoblast transplantation for severe postinfarction left ventricular dysfunction. *J Am Coll Cardiol*. 2003;41:1078-83.
8. Brazelton TR, Rossi FM, Keshet GI, et al. From marrow to brain: Expression of neuronal phenotypes in adult mice. *Science*. 2000;290:1775-9.
9. Theise ND, Nimmakayalu M, Gardner R, et al. Liver from bone marrow in humans. *Hepatology*. 2000;32:11-6.
10. Ferrari G, Cusella-De Angelis G, Colette M, et al. Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors. *Science*. 1998;279:1528-30.
11. Kocher AA, Schuster MD, Szabolcs MJ, et al. Neovascularization of ischemic myocardium by human bone-marrow-derived angioblasts prevents cardiomyocyte apoptosis, reduces remodeling and improves cardiac function. *Nat Med* 2001;7:430-6
12. Jackson KA, Majka SM, Wang H, et al. Regeneration of ischemic cardiac muscle and vascular endothelium by adult stem cells. *J Clin Invest* 2001;107:1395-402.
13. Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, et al. Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature*. 2001;410:701-5.
14. Quaini F, Urbanek K, Beltrami AP, et al. Chimerism of the transplanted heart. *N Engl J Med*. 2002;346:5-15.
15. Deb A, Wang S, Skelding KA, et al. Bone marrow-derived cardiomyocytes are present in adult human heart: A study of gender-mismatched bone marrow transplantation patients. *Circulation*. 2003;107:1247-9.
16. Wright DE, Wagers AJ, Gulati AP, et al. Physiological migration of hematopoietic stem and progenitor cells. *Science*. 2001; 294:1933-6.
17. Von Harsdorf R, Poole-Wilson PA, Dietz R. Regenerative capacity of the myocardium: Implications for treatment of heart failure. *Lancet* 2004;363:1306-13.
18. Wojakowski W, Tendera M, Michalowska A, et al. Mobilisation of CD34/CXCR4+, CD34/CD117+, c-met+ stem cells, and mononuclear cells expressing early cardiac, muscle, and endothelial markers into peripheral blood in patients with acute myocardial infarction. *Circulation*. 2004;110:3213-20.

19. Strauer BE, Brehm M, Zeus T, et al. Repair of infarcted myocardium by autologous intracoronary mononuclear bone marrow cell transplantation in humans. *Circulation*. 2002;106:1913-8.
20. Assmus B, Schachinger V, Teupe C, et al. Transplantation of progenitor cells and regeneration enhancement in acute myocardial infarction (TOPCARE-AMI). *Circulation*. 2002;106:3009-17.
21. Britten MB, Abolmaali ND, Assmus B, et al. Infarct remodeling after intracoronary progenitor cell treatment in patients with acute myocardial infarction (TOPCARE-AMI): Mechanistic insights from serial contrast-enhanced magnetic resonance imaging. *Circulation*. 2003;108:2212-8.
22. Kang HJ, Kim HS, Zhang SY, et al. Effects of intracoronary infusion of peripheral blood stem cells mobilised with granulocyte-colony stimulating factor on left ventricular systolic function and restenosis after coronary stenting in myocardial infarction: The MAGIC cell randomised clinical trial. *Lancet*. 2004;363:751-6.
23. Chen SL, Fang WW, Ye F, et al. Effect on left ventricular function of intracoronary transplantation of autologous bone marrow mesenchymal stem cell in patients with acute myocardial infarction. *Am J Cardiol*. 2004;94:92-5.
24. Wollert KC, Meyer GP, Lotz J, et al. Intracoronary autologous bone marrow cell transfer after myocardial infarction: The BOOST randomised controlled clinical trial. *Lancet*. 2004;364:141-8.
25. Nygren JM, Jovinge S, Breitbach M, et al. Bone marrow-derived hematopoietic cells generate cardiomyocytes at a low frequency through cell fusion, but not transdifferentiation. *Nat Med*. 2004;10:494-501.
26. Murry CE, Soonpaa MH, Reinecke H, et al. Hematopoietic stem cells do not transdifferentiate into cardiac myocytes in myocardial infarcts. *Nature* 2004;428:664-8
27. Forrester JS, Price MJ, Makkar RR. Stem cell repair of infarcted myocardium: An overview for clinicians. *Circulation*. 2003;108:1139-45.
28. Wollert KC, Meyer GP, Lotz J, et al. Intracoronary bone marrow cell transfer after myocardial infarction. Eighteen month's follow-up data from the randomized, controlled BOOST trial. *Circulation*. 2006;113:1287-1294.
29. Janssens S, Dubois C, Bogaert J, et al. Autologous bone-derived stem-cell transfer in patients with ST-segment elevation myocardial infarction: double-blind, randomised controlled trial. *Lancet* 2006;367:113-21.
30. Lunde K, Solheim S, Aakhus S, et al. Intracoronary injection of mononuclear bone marrow cells in acute myocardial infarction. The ASTAMI randomized controlled trial. *N Engl J Med* 2006;355:1199-209.
31. Schächinger V, Erbs S, Elsässer A, et al. Intracoronary bone marrow-derived progenitor cells in acute myocardial infarction. The REPAIR-AMI trial. *N Engl J Med* 2006;355:1210-21.
32. Tendera M, Wojakowski W, Ruzytto W, et al. Intracoronary infusion of bone marrow-derived selected CD34+CXCR4+ cells and non-selected mononuclear cells in patients with acute STEMI and reduced left ventricular ejection fraction: results of randomized, multicentre myocardial regeneration by intracoronary infusion of selected population of stem cells in acute myocardial infarction (REGENT) trial. *European Heart Journal* doi:10.1093/eurheartj/ehp073 (online)
33. Abdel-Latif A, Roberto B, Tleyeh IM, et al. Adult bone marrow-derived cells for cardiac repair, a systematic review and meta-analysis. *Ach Intern Med*. 2007;167:989-997.
34. Martin-Rendon E, Brunskill SJ, Hyde C, et al. Autologous bone marrow stem cells to treat acute myocardial

infarction: a systematic review. *European Heart Journal*. 2008;29:1807-1818.

35. Grebe O, Kestler HA, Merkle N, et al. Assessment of left ventricular function with steady-state-free-precession magnetic resonance imaging. Reference values and a comparison to left ventriculography. *Z Kardiol* 2004;93:686-95
36. Werner N, Kosiol S, Schiegl T, et al. Circulating endothelial progenitor cells and cardiovascular outcomes. *N Engl J Med* 2005;353:999-1007.
37. Yeh ETH, Zang S, Wu HD, et al. Transdifferentiation of human peripheral blood CD34+-enriched cell population into cardiomyocytes, endothelial cells, and smooth muscle cells in vivo. *Circulation* 2003;108:2070-3.
38. Chien KR. Stem cells: Lost in translation. *Nature* 2004;428:607-8.
39. Steen R, Morkrid L, Tjonnfjord GE, et al. c-kit Ligand combined with GM-CSF and/or IL-3 can expand CD34+ hematopoietic progenitor subsets for several weeks in vitro. *Stem cells* 1994;12:214-24.
40. Alison MR, Poulsom R, Forbes S, et al. An introduction to stem cells. *J Pathol* 2002;197:419-23
41. Penicka M, Widimsky P, Kobylka P, et al. Early tissue distribution of bone marrow mononuclear cells after transcatheter transplantation in a patient with acute myocardial infarction. *Circulation* 2005;112:e63-e65
42. Geng YJ. Molecular mechanisms for cardiovascular stem cell apoptosis and growth in the hearts with atherosclerotic coronary disease and ischemic heart failure. *Ann N Y Acad Sci* 2003;1010:687-97